

氏 名	永岡 唯宏
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	工 学
学位授与番号	博甲第3408号
学位授与の日付	平成19年 3月23日
学位授与の要件	自然科学研究科生体機能科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Creation of the human betacellulin mutein with low affinity for ErbB1 (ErbB1 低親和性ベータセルリン変異体の創製)
論文審査委員	助教授 妹尾 昌治 教授 山田 秀徳 教授 穴戸 昌彦 教授 尾坂 明義

学位論文内容の要旨

ベータセルリン (BTC) は上皮成長因子 (EGF) ファミリーに属する細胞成長因子である。BTC は EGF や TGF- α といった他の EGF ファミリーの因子と同様に細胞増殖を促進する働きとともに、BTC 独特の機能として細胞の分化を誘導しインスリンを分泌することで知られる膵臓 β 細胞の新生を促す働きももつ。また、BTC は EGF ファミリーの受容体として知られる ErbB 受容体ファミリーのうち ErbB1 と ErbB4 の二種類の受容体に結合する。しかし、BTC を二種類のそれぞれの受容体がどのように認識して結合するのかはまだ分かっていない。本研究ではそれぞれの受容体が認識する残基を調べるために BTC の EGF モチーフにランダム変異を導入した。変異遺伝子を導入した大腸菌のうち 190 クローンについて ErbB1、ErbB4 との結合性をスクリーニングした。すると、ErbB1 との親和性が低下したにもかかわらず ErbB4 との結合性は維持したままの BTC 変異体 2G10 が見つかった。MTT assay により Balb/c 3T3 の増殖刺激実験で BTC 変異体 2G10 の細胞増殖刺激活性が顕著に低下していることがわかった。一方、ラット膵腺癌由来 AR42J 細胞のインスリン分泌細胞への分化誘導活性を測定した。すると、BTC 変異体 2G10 の分化誘導活性は維持したままであることが分かった。BTC に最も近いアミノ酸配列を持つ TGF- α は過剰発現により細胞の癌化の惹起が指摘され、BTC でも同様の発癌性が懸念される。ところが BTC 変異体 2G10 は細胞増殖促進活性が低下しているため発癌性のリスクが低減されると考えられる。よって、この BTC 変異体は膵臓 β 細胞の新生を促して糖尿病を治療するための非常に有用なペプチドとなり得る。小島等によって BTC 遺伝子を肝臓に送達し肝臓細胞に膵臓 β 細胞の分化を促す試みがなされた (Nat. Med. 2003)。本研究室では肝臓を特異的に認識し遺伝子や低分子薬剤を送達するベクターであるバイオナノカプセル (BNC) を開発した。この BNC は B 型肝炎ウイルス由来で直径約 80 nm の中空カプセル状の構造で、表面に L-protein が露出するため肝臓細胞に対して高い特異性と感染性を示すが、中にウイルスゲノムを含まないためウイルス感染しない安全なベクターであり、BTC 変異体 2G10 遺伝子を肝臓細胞へ送達するための優れたベクターとして使えると考えられる。ところが BNC は長期間保存すると L-protein が酸化をうけてランダムなジスルフィド結合を形成し凝集してしまう。凝集すると薬剤の封入効率の低下を招くことが分かった。これを解決するために L-protein の S ドメインに存在する 14 個のシステインをセリンまたはアラニンに置換し凝集を防ぎかつ粒子形成する BNC を探索した。すると、それらのうち 8 個を同時に置換しても粒子形成に問題ないことがわかった。8 個のシステインを置換した Lm8-BNC は BNC に比較して高い抗酸化性を示し、凝集が抑制された。また、トリプシン耐性も BNC に比べ向上した。さらに GFP 発現遺伝子を封入した Lm8-BNC をヒト肝癌由来 HepG2 細胞に対して導入して遺伝子導入効率を蛍光強度により調べたところ、Lm8-BNC は BNC よりも 2~5 倍高い導入効率を示した。本研究では安定性、遺伝子導入効率の向上した洗練された BNC を開発することに成功した。

論文審査結果の要旨

血糖値の調節能力が低下する病気として糖尿病がその代表であるが、インスリン産生細胞の再生が治療の鍵を握る場合が多く、再生手法による膵β細胞の新生が現実的な治療法として期待されている。膵β細胞は膵臓以外にも肝臓に存在する体性幹細胞からも分化させることが可能で、膵臓という足場を失っても肝臓を足場として膵β細胞が再生できる。そこで、本論文ではこの膵β細胞の新生を促すベータセルリン（BTC）を取りあげその有効性を検討している。BTC は膵臓および肝臓の幹細胞様細胞をインスリン産生細胞に分化させる一方で、上皮成長因子（EGF）ファミリーの受容体 ErbB1 と ErbB4 を活性化するが、ErbB1 の刺激は細胞増殖を促進して癌化を誘発することがある。この問題を解決するために、ランダムな変異を導入した BTC 変異体ライブラリーを作製し、スクリーニングして ErbB1 に対する親和性が失われた BTC 変異体 2G10 を得た。この変異体では EGF モチーフの一アミノ酸残基が変異しており、細胞増殖促進活性が減弱した反面、インスリン分泌細胞の分化誘導活性を維持していた。すなわち、2G10 は発癌性のリスクが低く、膵β細胞の新生を促す有用なペプチドであることが示唆された。2G10 の遺伝子を肝臓に送達すれば、肝臓幹細胞を膵β細胞へ分化させる遺伝子治療が可能になると考え、ヒト B 型肝炎ウイルスの表面タンパク質（L-protein）で構成されるバイオナノカプセル（BNC）を利用する発想に至ったが、BNC は長期間保存すると L-protein が酸化をうけてランダムなジスルフィド結合を形成し凝集し薬剤の封入効率の低下を招く問題があった。これを解決するために L-protein に存在する 14 個のシステイン残基を置換して、凝集を防ぐことができる組み合わせを探索した。その結果、8 個を同時に置換した L-protein で形成される Lm8-BNC を作製した。この Lm8-BNC は抗酸化性が向上して凝集が抑制され、遺伝子導入効率も向上していた。安全な BTC 変異体 2G10 と Lm8-BNC を組み合わせた遺伝子デリバリーシステムは将来有望な糖尿病治療法となり得る。本方法が、膵島β細胞の再生医療の手段として今後有望であることを認め、審査委員の全員が本論文を学位にふさわしい論文であると評価した。